

Rapid adhesion method for separating riched hair follicle stem cell

Publication number: CN1594554
Publication date: 2005-03-16
Inventor: XU ZENGLU (CN); QIU WENYING (CN); LIU BINGCI (CN)
Applicant: INST OF BASIC MEDICINE CHINESE (CN)
Classification:
- **international:** **C12N5/08; C12N5/08;** (IPC1-7): C12N5/08
- **European:**
Application number: CN20031057045 20030912
Priority number(s): CN20031057045 20030912

Report a data error here

Abstract of CN1594554

The invention relates to a method for separating hair follicle stem cell through adhesive. Due to small amount of adult hair follicle stem cell, it is difficult to separate and purify. Flow type cell method etc. all need expensive apparatus, and have complicated technology. The invention takes advantage of the property that adhesivity of stem cell is stronger than other differentiated cell, establishes a simple method for separating and collecting hair follicle stem cell. The method comprises: utilizing double digestion method to obtain hair follicle mixed liquid, inoculating in culture dish coating with human collagen. After a period of time, stem cell adhere to collagen while other cells are removed through cleaning, so high concentration adult hair follicle stem cell is gained. Expression of hair follicle stem cell marker K19 after purification increases to 1.6 times than before, in vitro colony increases 3.5 times, which favor stem cell transplantation and further clinical and experiment research.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03157045.3

[43] 公开日 2005 年 3 月 16 日

[11] 公开号 CN 1594554A

[22] 申请日 2003.9.12 [21] 申请号 03157045.3

[71] 申请人 中国医学科学院基础医学研究所

地址 100005 北京市东单三条 5 号

[72] 发明人 许增禄 仇文颖 刘秉慈

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称 快速粘附法分离富集毛囊干细胞

[57] 摘要

本发明涉及通过粘附法分离毛囊干细胞的方法。由于成年人的毛囊干细胞数量少，很难分离和纯化。流式细胞术等方法均需要昂贵的设备，技术复杂。而干细胞具有粘附能力强于其他分化细胞的特点。本发明利用这一特点，建立一种简便易行的分离及富集毛囊干细胞的方法。包括利用双重消化的方法获得毛囊细胞混合液，接种于事先包被有正常人胶原的培养皿内，经过一定时间后，干细胞粘附在胶原上而其他细胞则通过清洗祛除，由此获得高浓度的成人毛囊干细胞。利用这种方法可以迅速地获得大量成人毛囊干细胞，纯化后的细胞毛囊干细胞标志物 K19 的表达增加 1.6 倍，体外集落形成率增加 3.5 倍，有利于干细胞移植和进一步的临床和实验室研究。

- 1、一种毛囊干细胞分离富集方法，包括：
 - 1) 从成人头皮毛囊中分离包含毛囊各部分角质细胞在内的多种细胞混合液。
 - 2) 通过粘附法从成人头皮毛囊的多种细胞中分离、富集了毛囊干细胞。
- 2、如权利要求1所述的毛囊干细胞分离方法，其中从成人头皮毛囊中分离包含毛囊各部分角质细胞在内的多种细胞混合液的方法包括
 - 1) 利用双重消化的方法从缩皮手术中取得的头皮中获得细胞悬液。
 - 2) 细胞悬液在特定的培养基中进行培养扩增。
- 3、如权利要求1所述的毛囊干细胞分离方法，其中所述的粘附法是指将毛囊细胞混合液接种于事先包被有正常人皮肤来源胶原的培养皿内，经过一定时间的粘附后，粘附能力强的干细胞粘附在胶原上而其他细胞则通过清洗祛除，由此获得高浓度的成人毛囊干细胞。

快速粘附法分离富集毛囊干细胞

技术领域

本发明涉及干细胞分离方法，具体涉及通过粘附法分离毛囊干细胞的方法

背景技术

成年人的毛囊干细胞属于成体干细胞，数量小，很难分离和纯化。根据毛囊干细胞的形态特点和表面标志，有这样几种分离方法：密度梯度离心，细胞离心淘洗技术（centrifugal elutriation），流式细胞术（flowcytometry）等。密度梯度离心的方法已使用多年，分离效率中等，而且所需设备简单，但最大的问题是获得的细胞纯度低。尤其当需要长期培养时效果差。流式细胞术分离细胞主要依赖对细胞表面标志进行荧光标记后分选，同时可结合细胞大小等特征参数。目前为止，人们还没发现一种表面标志能专一地标记毛囊干细胞。因此，目前多用两种或两种以上的分子标志。Tani 等选用了抗 $\alpha 6$ 整合素抗体和 CD71 单克隆抗体对小鼠表皮来源的角质细胞进行双标分选，其中 $8.1 \pm 2.0\%$ 的细胞高表达 $\alpha 6$ 整合素而低表达 CD71，表皮中 $71.95 \pm 14.02\%$ 的标记维持细胞，即干细胞均居其中。（Tani H, Morris RJ and Kaur P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. PNAS. 2000; 97(20): 10960-10965）流式细胞术分离效率最高，但获得的细胞数量相对较少；所需的实验设备复杂，操作过程多，对细胞造成伤害的机会大，不利于以后的培养应用。而且，目前还没有用流式细胞术分离毛囊细胞的报道。

利用干细胞粘附性强的特点可以对干细胞进行分离纯化。无论是表皮还是毛囊的干细胞都牢固地定位在基底膜上，分裂产生的子代细胞将逐步脱离基底层。因此，细胞悬液中，干细胞与基底膜成分的结合能力最强，粘附也就最快。Jones 及 Watt 将表皮角质形成细胞悬液接种于包被有 IV 型胶原、纤维粘连蛋白、层粘连蛋白等的培养皿上。结果发现，在 IV 型胶原上粘附 20min 后收获的细胞占全部基底层细胞的 10%，克隆形成能力增加 5.5 倍，而且在移植到裸鼠皮下后可以形成具有四层细胞（基底层，棘层，颗粒层和角化层）的表皮。（Jones PH and Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. Cell. 1993; 73: 713-724）通过粘附特性分离出来的细胞符合干细胞的特征，即使纯度还有待提高，但至少能对干细胞起到富集的作用。目前，还没有利用类似方法对毛囊干细胞进行分选的报道。

发明内容

本发明的目的是利用毛囊干细胞粘附性强的特点，建立一种简便易行的分离及富集毛囊干细胞的方法。本发明的内容是一种毛囊干细胞分离富集方法，包括从成人头皮毛囊中分离

包含毛囊各部分角质细胞在内的多种细胞混合液和通过粘附法从成人头皮毛囊的多种细胞中分离、富集毛囊干细胞。从成人头皮毛囊中分离包含毛囊各部分角质细胞在内的多种细胞混合液的方法包括利用双重消化的方法从缩皮手术中取得的头皮中获得细胞悬液和细胞悬液在特定的培养基中进行培养扩增。粘附法是利用毛囊干细胞粘附能力强的特点，将毛囊细胞混合液接种于事先包被有正常人皮肤来源胶原的培养皿内，经过一定时间的粘附后，干细胞粘附在胶原上而其他细胞则通过清洗祛除，由此获得高浓度的成人毛囊干细胞。利用这种简便易行的毛囊干细胞分离方法可以迅速地获得大量成人毛囊干细胞，有利于干细胞移植和进一步的临床和实验室研究。

具体实施方式

毛囊细胞悬液的获得：患者术中取下的额颞部头皮立即置于过滤除菌的 DMEM 中，4℃保存。4h 内于超净工作台内取出头皮，75%酒精擦拭，用 D-Hank's 液冲洗，剪成约 3mm 宽，5mm 长的小块，再以 D-Hank's 液冲洗。放入胰蛋白酶/胶原酶混合液中，4℃消化过夜。在体视显微镜下，用钟表镊顺毛囊生长方向轻轻拔出完整的毛囊，置胰蛋白酶中，用锋利的剪刀剪碎，37℃消化 1h。消化液经 200 目不锈钢滤网过滤，加入 10%血清终止消化。室温下 1000rpm 离心 5min，去除胰蛋白酶。DMEM 液洗一次后加入毛囊细胞生长培养液，计数后按 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于 25cm^2 培养瓶中，36.5℃，5%CO₂ 培养箱培养，每 2—3d 换液，4—6d 传代。

皮肤胶原培养支持物制备：取拉皮手术后多余的皮肤，灌注法清除血液至清洁。将皮肤组织剪碎，于 NaCl 溶液中匀浆，除去非胶原性杂质，以蒸馏水洗涤以除去盐分。用 20 倍体积 0.5mol/L 乙酸溶液悬浮，加入胃蛋白酶，搅拌 24h。离心 20min，取上清，留沉淀再次以胃蛋白酶消化。上清加 NaCl 至终浓度为 5%，搅匀，放置过夜。离心 20min，弃上清，留沉淀。沉淀再次溶解于 0.5mol/L 乙酸溶液中，加 NaCl 至终浓度 5%，搅匀，放置过夜。离心 20min，如此重复纯化三次。将胶原提取物进行成纤维处理。胶原溶于 0.05mol/L 乙酸溶液中，用 0.02mol/L PBS 透析至中性。

包被培养板及培养瓶：超净台中将人胶原溶液加入 24 孔板及 25cm^2 培养瓶中，成一薄层。置超净台中使之正常挥发。干燥后用 D-Hank's 液洗涤。使用前再用培养液水合。

快速粘附法分离富集毛囊干细胞：7—8 代的毛囊细胞 ($5 \times 10^5/\text{ml}$) 接种于事先铺好人胶原的 24 孔板中，37℃ 5%CO₂ 孵箱中培养，分别于 5、10、20、40、60min 后吸出培养液，计数后入另一孔中，原孔中另加 1ml 培养液，继续培养。

根据集落形成能力鉴定干细胞：分选前后的毛囊细胞以 $10^2/\text{ml}$ 接种于 60mm 平皿中，培养 7d 后，以温 D-Hank's 液洗 2 次，5min/次。甲醇固定 10min。Gimsa 染液与 Sorensen 缓冲

液以 1: 9 配置后, 染色 10—15min, 流水冲去多余染料, 空气干燥。镜下计数形成集落数, 计算集落形成率。

毛囊干细胞标志物的检测: 24 孔板中事先放入高压蒸汽灭菌的盖玻片, 以人胶原包被。细胞粘附分选后继续培养 1d。温 D-Hank's 液洗 2 次, 冷丙酮固定 1min, 冷 PBS 洗 2 次, 每次 5min。—20℃ 保存备用。玻片以冷 PBS 洗 2 次, 每次 5min。用 PBS 稀释的 10% 正常兔血清封闭, 4℃ 30min。吸去血清后, 滴加 1: 100 稀释的山羊抗人 Integrin β 1 一抗, 4℃ 过夜。冷 PBS 洗 3 次, 每次 5min。滴加 1: 100 稀释的生物素化兔抗山羊二抗, 37℃ 30min。冷 PBS 洗 3 次, 每次 5min。滴加碳酸氢钠缓冲液 (pH 8.2) 1: 200 稀释的 DCS, 4℃ 1h。冷 PBS 洗 4 次, 每次 5min。用 PBS 稀释的 10% 正常山羊血清封闭, 4℃ 30min。吸去血清后, 滴加 1: 50 稀释的小鼠抗人 Keratin 19 一抗, 4℃ 过夜。冷 PBS 洗 3 次, 每次 5min。滴加 1: 100 稀释的 TRITC 标记的山羊抗小鼠二抗, 4℃ 1h。冷 PBS 洗 3 次, 每次 5min。PPd 甘油封片。镜检摄像。阴性对照以正常血清代替一抗。

粘附分离富集实验结果显示, 随粘附时间的延长, 粘附到胶原上的毛囊上皮细胞数量逐渐增多, 上清培养液中细胞数逐渐减少, 毛囊干细胞标志物: β 1 整合素和 K19 阳性细胞比例逐渐增加, 粘附细胞集落形成能力逐渐降低。 $5.0 \pm 0.1 \times 10^5/\text{ml}$ 的毛囊细胞经过粘附 20 分钟后, 未粘附的细胞数量为 $2.7 \pm 0.2 \times 10^5/\text{ml}$, 而此时 K19 阳性细胞率由最初的 $8.4 \pm 1.3\%$ 增加到 $21.7 \pm 3.2\%$, 集落形成率由 $8.6 \pm 1.4\%$ 上升到 $87.4 \pm 3.8\%$ 。说明人胶原快速粘附 20 分钟可有效地分离富集毛囊干细胞。